

⑪ 公開特許公報 (A)

平1-125395

⑤Int.Cl.⁴
 C 07 H 21/04
 B 01 J 20/26
 C 08 G 81/00
 C 12 N 15/00

識別記号
NUT

府内整理番号
7417-4C
L-6939-4G
8016-4J
A-8412-4B審査請求

⑩公開 平成1年(1989)5月17日
未請求 請求項の数 36 (全12頁)

⑪発明の名称 核酸捕獲試薬

⑫特 願 昭63-191983

⑬出 願 昭63(1988)7月28日

優先権主張 ⑭1987年7月29日⑮米国(U S)⑯078,991

⑭發明者 ギュリラット・ゲベエ	アメリカ合衆国20910 メリーランド、シルバー・スプリング、ヘイル・プレイス 9512番
⑭發明者 レオナルド・クレバン	アメリカ合衆国20855 メリーランド、ダーウッド、アイロン・フォージ・コート 7702番
⑭發明者 ジヨン・ディー・ハーディング	アメリカ合衆国20854 メリーランド、ボトマツク、バツクハノン・ドライブ 8501番
⑮出願人 ライフ・テクノロジーズ・インコーポレイテッド	アメリカ合衆国20877 メリーランド、ゲテルスブルグ、ピー・オー・ボックス 6009号 グローブメント・サークル 8717番
⑯代理人 弁理士 青山 蔦	外1名

明細書

は磁気ビーズを含む、請求項6記載の核酸捕獲試

1. 発明の名称

核酸捕獲試薬

薬。

2. 特許請求の範囲

- (1)挿入(インターラーティング)部分およびリンカー分子により前記部分に連結された固体支持体を含み、前記部分を試料中の核酸分子と結合させる方式で試料から核酸を分離する核酸捕獲試薬。
- (2)リンカーが荷電状態である、請求項1記載の核酸捕獲試薬。
- (3)リンカーが非荷電状態である、請求項1記載の核酸捕獲試薬。

(8)固体支持体がポリマー性である、請求項1記載の核酸捕獲試薬。

- (4)リンカー分子がポリアミンである、請求項1記載の核酸捕獲試薬。

(9)ポリマー固体支持体の形態が、チューブ、ディップスティックまたはマイクロタイター・プレートから成る群から選ばれる、請求項8記載の核酸捕獲試薬。

- (5)ポリアミンが、スペルミジンおよびスペルミンから成る群から選ばれる、請求項4記載の核酸捕獲試薬。

(10)固体支持体が膜である、請求項1記載の核酸捕獲試薬。

- (6)固体支持体がビーズ材料である、請求項1記載の核酸捕獲試薬。

(11)膜がナイロンから成る、請求項10記載の核酸捕獲試薬。

- (7)ビーズ材料がセファロース、アガロースまた

(12)試料が、血清、頸管組織、糞、唾液、血液、尿、体内組織および体液から成る群から選ばれた生物学的試料である、請求項1記載の核酸捕獲試薬。

(13)挿入部分が、エチジウム、メチジウム、アクチノマイシン、マラカイト・グリーン、フェニル・ニュートラル・レッドまたはアクリジンの誘導体から成る群から選ばれる、請求項1記載の核酸

捕獲試薬。

- (14)挿入部分がメチジウムである、請求項13記載の核酸捕獲試薬。
- (15)挿入部分がエチジウムである、請求項13記載の核酸捕獲試薬。
- (16)メチジウムを含む挿入部分、およびポリアミンを含むリンカー分子により前記メチジウム部分に連結された固体支持体を含み、前記メチジウム部分を試料中の核酸分子と結合させる方式で試料から核酸を分離する核酸捕獲試薬。
- (17)試料が、血液、尿、頸管組織から成る群から選ばれた生物学的試料である、請求項16記載の核酸捕獲試薬。
- (18)固体支持体が、セファロース、アガロースまたは磁気セルロースから成る群から選ばれたビーズ材料である、請求項16記載の核酸捕獲試薬。
- (19)固体支持体がセファロースである、請求項18記載の核酸捕獲試薬。
- (20)固体支持体が磁気セルロースである、請求項16記載の核酸捕獲試薬。

- 3 -

- (27)接触させる前に、十分量の試薬により試料を処理して試料中のウイルス粒子があればそれらを崩壊および除蛋白質する、請求項26記載の方法。
- (28)単離された複合体から核酸を分離する、請求項25記載の方法。
- (29)単離段階が遠心分離を含む、請求項25記載の方法。
- (30)単離段階がろ過を含む、請求項25記載の方法。
- (31)単離段階が磁気分離を含む、請求項25記載の方法。
- (32)分離段階が捕獲試薬-核酸複合体の希アルカリ処理を含む、請求項28記載の方法。
- (33)試料が前精製されていない臨床試料である、請求項29記載の方法。
- (34)インキュベーションが約1モルより高い塩濃度で行なわれる、請求項25記載の方法。
- (35)試料が核酸を含有するゲルである、請求項29記載の方法。

(21)ポリアミンがスペルミジンまたはスペルミンである、請求項16記載の核酸捕獲試薬。

(22)ポリアミンがスペルミンである、請求項16記載の核酸捕獲試薬。

(23)メチジウム部分、およびスペルミンを含むリンカー分子により前記メチジウム部分に連結されたビーズ状材料から成る固体支持体を含み、前記メチジウム部分を試料中の核酸と結合させる方式で生物学的試料から核酸を分離する核酸捕獲試薬。

(24)ビーズ材料が、セファロース、アガロースまたは磁気セルロースから成る群から選ばれる、請求項23記載の核酸捕獲試薬。

(25)請求項1記載の捕獲試薬を試料と接触させ、試料-捕獲試薬混合物を十分な時間インキュベーションすることにより、捕獲試薬を試料中の核酸と結合させて捕獲試薬-核酸複合体を形成させ、試料から前記複合体を単離することから成る、試料から核酸を分離する方法。

(26)試料を処理することにより、そこからDNAを放出させる、請求項25記載の方法。

- 4 -

(36)試料が、血清、頸管組織、糞、唾液、血液、尿、体内組織および体液から成る群から選ばれた生物学的試料である、請求項25記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

【発明の背景】

【発明の分野】

この発明は、複合した生物学的または臨床試料からの核酸の分離および単離または精製の分野に関する。

【先行技術の簡単な記載】

液体生物学的試料からのデオキシリボ核酸(DNA)の様々な分離方法は当業界において公知であるが、非常な時間の浪費または複雑で面倒なものである。

DNAがニトロセルロースに付着することは公知である。DNAを含有する液体試料をニトロセルロース・フィルターに適用すると、DNAはフィルターに付着または結合する。問題となるのは、蛋白質もまたニトロセルロースに結合することである。従って、この方法はDNAだけに特異的な

ものではない。

試料からの別のDNA分離方法は、スクロースまたは塩化セシウム密度勾配による超遠心分離である。この方法では、浮遊密度または沈降係数に従い、DNAを他の巨大分子、例えば蛋白質から分離する。生物学的試料を遠心分離管において密度勾配により層状にし、非常に高速で長期間回転させて密度勾配によりDNAを浮遊させる。この方法は、満足すべきものであるが、非常な時間の浪費で骨の折れる方法である。遠心分離時間は1試料当たり20時間またはそれ以上であり得る。さらに、試料を長く回転させ過ぎた場合、DNAは試料から分離するが、試料中の他の成分と一緒に遠心分離管の真底へ勾配を完全に通過してしまう。従って、この方法もまた複合体試料からの迅速で容易なDNA分離方法として適当ではない。

液体試料からの化学的なDNA分離方法もまた公知である。フェノール抽出およびエタノール沈殿は標準的な実験方法であるが、各々難点を有する。フェノールは毒性物質であり、フェノール抽

出の場合、統いて時間のかかる処理、例えば他の有機試薬による抽出または透析を行うことにより試料を精製する必要がある。さらに、複合体混合物からのDNAの分離は、核酸結合特性を有する分子からの妨害を被る。エタノールはDNAのみならず多くの蛋白質を沈殿させるため、DNAをさらに試料中の他の蛋白質全てから分離しなければならない。

最後の方法として、アガロースまたはポリアクリルアミド・ゲル電気泳動を用いて生物学的試料からDNAを分離する。この方法では、ゲルを含むガラスまたはプラスチック・レセプタクルの一端に試料を適用し、電流をレセプタクルの全長に適用する。負に荷電している核酸分子は陽極に向かって移動するが、分子が大きいとゆっくりと移動する。分子の移動速度は、それらの分子量並びにゲル材料中における架橋の濃度および程度に左右される。次いで、DNAが位置するゲルの部分を切り取り、最後にDNAを抽出することにより、DNAをゲルから除去する。これもまた時間の浪

-7-

費で非常に骨の折れる方法であり、さらにDNAをゲルから分離しなければならない。

電気泳動ゲル法によりDNAを分離する場合、DNAを何等かの方法で染色して可視化する必要がある。一般的に、エチジウムプロマイド(EB)を染色剤として使用する。エチジウムプロマイドは、DNAの二重螺旋構造DNA塩基対間の挿入(インターラーニング)によりDNAに付着する。DNA染色におけるエチジウムプロマイドの使用は、シャープ等、「ディテクション・オブ・トゥ・リストリクション・エンドヌクレアーゼ・アクティビティーズ・イン・ヘモフィルス・パラインフルエンザエ・ユージング・アナリティカル・アガロース-エチジウム・プロマイド・エレクトロフォレシス」、「バイオケミストリー」(Biochemistry)、12巻、3055-3063頁(1973年)に記載されている。この参考文献は、エチジウムプロマイドがDNAの染色に使用される制限酵素の急速な検定を開示している。

染色剤としてのエチジウムプロマイドの幾分異

-8-

なる適用法には、エチジウムプロマイドを固体支持体に結合させる例がある。米国特許第4119521号(キリキヤン、1978年10月10日付)は、活性化多糖類の蛍光DNA挿入剤誘導体を開示している。この特許における誘導体は、蛍光染料として機能し、短波長紫外放射線励起下においてDNAおよびそれらのフラクションの直接的可視化を達成する。この特許で使用される挿入剤は、エチジウムハライドであり、好ましい薬剤はエチジウムプロマイドである。この薬剤は活性化多糖類、例えばアガロースと共有結合する。

ダーバンおよびベッカー、「モレキュラー・レコグニション・オブ・DNA・バイ・スマート・モレキュールズ。シンセシス・オブ・ビス(メチジウム)スペルミン、ア・DNA・ポリインターカレイティング・モレキュール」、「ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・ケミカル・ソサエティー」(J.Amer.Chemical Society)、100巻、1968-1970頁(1978年)は、ビス(メチジウム)スペルミン(BMSp)の合成および研究を開示

している。この分子は、スペルミン・リンカーにより連結された2つの別々のメチジウム挿入剤の存在故にポリインターラーカレーターとして記載された。スペルミンは、核酸に対するその公知アフィニティーおよびその長さ故にインターラーカレーターとの結合に選択され、隣接排除結合モデルによる非隣接挿入部位への到達に十分な結合構造を呈している。

さらにダーバンおよびベッカーの研究は、BMSpおよびエチジウムプロマイドが同様に挿入することを示した。しかしながら、BMSpは、モノマー、エチジウムプロマイドよりも数段階強力な結合定数を有する。

バチェック等、「アナリティカル・バイオケミストリー」(Analytical Biochemistry)、124巻、414-420頁(1982年)は、遊離溶液並びにポリアクリルアミドおよびアガロース・ゲルから核酸を回収するエチジウムー・アクリルアミド・アフィニティー媒質を開示している。このアフィニティー媒質は、エチジウムプロマイドが付着し

ているアクリルアミド・マトリックスを成分とする。明らかに、核酸は緩衝塩溶液によりこの媒質から溶離され、直接エタノール沈澱により濃縮され得る。

エチジウムー・アクリルアミド・アフィニティー媒質は、ポリアクリルアミド・マトリックスの存在下、適当な緩衝液中、エチジウムプロマイド、BIS(N,N-メチレンビスアクリルアミド)、TEMED(N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン)および過硫酸アンモニウムの反応により合成される。エチジウムプロマイドが存在する場合、それはメチレンビスアクリルアミド・スペイサー・アームによるアクリルアミド・マトリックスとの共有結合であると思われる。

この参考文献は、微粒子アクリルアミド・マトリックスとしてのバイオ-ゲルP-4の使用を開示している。メチレンビスアクリルアミドの架橋特性は、エチジウムとバイオ-ゲルP-4の結合に明らかに重要である。このゲルとエチジウムとの結合はまた、ある程度反応における緩衝液の組

-11-

成により異なる。著者は、アフィニティー媒質との相互作用に十分な時間を与えること(すなわち、6mMスポット中3mMペッド容量および15分平衡において0.44mM/分の流速)は定量的結合に不可欠であると記している。しかしながら、カラムによる15分平衡直後のRNAの溶離は、何等かの明白な不可逆性結合の回避に必要であった。

トーマスおよびシェヘター、「アナリティカル・バイオケミストリー」(Analytical Biochemistry)、91巻、209-223頁(1978年)は、置換アガロース・ゲルに基づく直接的物理的測定およびゲル結合エチジウムの転移RNAへの挿入の証拠を開示している。この参考文献は、エチジウムプロマイド塩(3,8-ジアミノ-5-エチル-6-フェニルフェナントリジニウムプロミド)のカチオンが中間体3,3'-ジアミノジプロビルアミノスクシニル・スペーサー・アームを介してアガロース・マトリックスと共有結合していたことを報告している。

この文献はまた、分配結合およびゲル自体の直

接スペクトル測定から測定されたアガロース・ゲルと共有結合したエチジウムカチオンとtRNAの結合の化学量および性質を開示している。様々な測定の実施によりエチジウムーtRNA相互作用の研究を行った。蛍光増大およびスペクトル赤方偏移を観察および測定すると、ゲルに結合したtRNAの量に比例していた。また実験により、NaCl濃度を高めるとゲルに結合したtRNAのパーセンテージは低下することが示された。約1.3またはそれより高いモル濃度の場合、0%の結合状態であった。著者は、エチジウムプロマイドが挿入によりtRNAと結合しているという結論に達した。この参考文献は、複合体未精製混合物、例えば臨床試料からDNAまたはRNAを単離する捕獲試薬の現実的または推論的使用法を全く証明していない。従って、未精製臨床試料からの迅速で有効なDNA分離方法に対する要望がなお存続している。

【発明の要旨】

この発明の核酸捕獲試薬は、DNA螺旋中に捕

入可能な分子を含む。分子リンカーを介して固体支持体にインターラーカーを付着させる。挿入分子および場合によりリンカーは、緩衝系または複合体生物流体に存在する核酸に結合する。固体支持体の不活性特性により、単純な手順、例えば短い遠心分離またはろ過手段による非結合材料からの前記捕獲試薬-核酸複合体の分離が可能となる。一旦捕獲試薬-核酸複合体が試料の残りから分離されると、結合した核酸は簡単に捕獲試薬から放出および分離され得る。放出された核酸は例えば分子ハイブリダイゼーション方法により特性証明および定量化され得る。

この発明の捕獲試薬を用いて未精製生物試料、例えば血清、頸管試料、糞試料、唾液(痰)、血液、尿、体内組織および体液から核酸を単離することができる。また捕獲試薬を用いて、ハイブリダイゼーションされていない材料の酵素消化から生成した小核酸フラグメントからハイブリダイゼーションされた核酸を分離することもできる。さらに、捕獲試薬を用いて、プラスミド試料において直線

状DNAおよび切り込み環状DNAからスーパー・コイル・プラスミドを分離することができる。また、この発明の捕獲試薬を用いて可溶化アガロースまたはアクリルアミド・ゲルから核酸を単離することもできる。DNAを含有または成分とする他の試料もこの発明の捕獲試薬および方法により使用され得る。この発明の捕獲試薬および方法を用いる常用のスクリーニングによりこれらの試料を試験して特定のDNAおよび試料に対するこの発明の有効性を確認することができる。

複合体生物学的溶液からの捕獲試薬の除去は、遠心分離、ろ過、または磁気セルロースを固体支持体として使用する場合は磁場の使用により達成され得る。

[好ましい具体例の記載]

この発明の核酸捕獲試薬は、リンカー分子手段により固体支持体に連結された、二重鎖核酸分子中に挿入可能な挿入部分を含む。

具体的には、挿入部分はエチジウムまたはメチジウムまたは他の挿入分子、例えばアクチノマイ

シン、マラカイト・グリーン、フェニル・ニュートラル・レッドもしくはアクリジンの誘導体であり得る。リンカー分子は荷電または非荷電状態であり得、

$$(C_2H_5)_n, n > 2; (-C_2H_5)_n N C(C_2H_5)_m,$$

$$\begin{array}{c} || \\ O \end{array}$$

$$n \text{ および } m > 2$$

の形または2個より多いアミド結合により一緒に連結された他のメチレン基

$(C_2H_5)_n S S (C_2H_5)_m, n \text{ および } m > 2;$
 およびポリアミン類、例えばスペルミジンおよびスペルミンであり得る。リンカーは最も好ましくはスペルミンである。

固体支持体は、ビーズ材料、例えばセファロース、アガロースもしくは磁気セルロースであり得、またはチューブ、ディップスティックもしくはマイクロタイター・プレートの形のプラスチック材料であり得、または膜(例、ナイロン)の形であり得る。

まず、挿入部分および固体支持体がアミド、カルバメート、尿素、エーテル、チオエーテル、ア

ミンまたは固定化に常用される他の結合(リング)を介して一緒に連結され得る形でそれらを修飾する[「アフィニティー・クロマトグラフィー」(Affinity Chromatography)、ホフマン-オステルホフ編、ベルガモン・プレス、1978年、「アフィニティー・クロマトグラフィー」(Affinity Chromatography)、ファルマシア・ファイン・ケミカルズの発表]。例えば、カルボキシ基を含ませるべく固体支持体を修飾する場合、リンカー(例、スペルミンまたはジアミノアルカン)の付加により反応性アミンを含ませるべくインターラーカーを修飾することができる。ジクロヘキシルカルボジイミドのような結合剤を用いると、支持体およびインターラーカーはアミド結合を介して一緒に連結され得る。別法として、カルボキシ基は反応性エステル(例えばN-ヒドロキシスクシニミドエステル)に変換され得、次いでアミンと反応する。逆に、支持体はアミンにより修飾され得、インターラーカーはカルボキシ基を含ませるべく修飾され、2つの部分は前記に従い一緒に

に結合され得る。

核酸を含有し得る臨床生物試料の前精製は必ずしも必要ではない。この発明の捕獲試薬を脱イオン水に懸濁し、生物学的試料に加え、十分な時間インキュベーションして捕獲試薬と核酸を結合させることにより、捕獲試薬-核酸複合体を形成させる。インキュベーション時間は通常室温で30分である。遠心分離、ろ過または磁気分離法により捕獲試薬-核酸複合体を単離する。

最後に、例えば捕獲試薬-核酸複合体を希アルカリで処理することにより、核酸を単離された複合体から分離する。例えば、複合体をNaOHと混合し、遠心分離を行い得る。上清は捕獲試薬から分離されたばかりの核酸を含む。粗試料、例えばひと血清は多量、例えば2mLの量で使用され得るものとする。

A. 捕獲試薬の合成

スペルミン・リンカーを介してセファロースまたは磁気セルロースと結合したメチジウムを含む核酸捕獲試薬を次の要領で合成した。ダーバンおよびベッカーの手順[「ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・ケミカル・ソサエティー」(J.Amer.Chem.Soc.)、100(6)巻、1968頁(1978年)、この内容を引用して説明の一部とする]に従い、p-カルボキシメチジウムクロリドをo-アミノビフェニルから合成した。まずカルボキシ基をカルボニルジミダゾールにより活性化し、その結果形成されたイミダゾリデートを過剰のスペルミンで処理することにより、スペルミンをp-カルボキシメチジウムクロリドに結合させた。メチジウムスペルミン付加体をフラッシュ・クロマトグラフィーにより精製し、N-ヒドロキシスルキンイミド活性化セファロースまたは過よう素酸活性化磁気セルロースと反応させることにより、不活性支持体上に固定化した。別法として、反応性アミンを含む磁気セルロースをジスクシンイミジルス

- 19 -

ペレート、次いでメチジウムスペルミンで処理することにより、DNA捕獲試薬を得る。

B. 試薬の使用

放射性標識したDNAを緩衝液または生物学的流体に加え、溶液を捕獲試薬とインキュベーションし、生成したDNA-捕獲試薬複合体を遠心分離により試料から分離する実験を実施した。希NaOHで処理することによりDNAを捕獲試薬から放出させ、定量した。これらの実験は、溶液中に最初に存在する放射性DNAが80%を越える比率で試薬により結合していること、および結合したDNAが95%より大きい比率で水酸化ナトリウム処理により放出されることを示した。試験される緩衝液としては、(1)EDTAおよび様々な濃度(0.1~3モル)のNaClを含むトリス-HCl緩衝液、(2)蛋白質変性原、例えば尿素およびグアニジン塩酸塩を含むトリス-HCl緩衝液、並びに(3)0.5%トライトンX-100および緩衝液を含む細胞輸送媒質があった。

またこれらの実験は、比較的多量(例、0.5~

- 20 -

1.0mL)の試料中に存在する少量(例、ナノグラム単位)のDNAおよび少量(100μL未満)の試料中に存在する多量(マイクログラム単位)のDNAの定量的結合を示した。

捕獲試薬を用いて生物学的流体から臨床的に興味深い特定のDNA配列を単離し得ること、希NaOH溶液におけるインキュベーションにより試薬から放出されたDNAは固体支持体(ニトロセルロースまたはナイロン膜)と結合し、分子ハイブリダイゼーション・プロトコル法により同定および定量され得ることを示す実験を実施した。具体的には、頸管スワップ(綿棒で集めた試料)中に存在する材料が懸濁および/または溶解している溶液からピコグラム量のひと乳頭腫ウイルスDNAを単離した。次いで、試薬により捕獲されたウイルス性DNAのパーセンテージをハイブリダイゼーションにより定量した。同様に、この発明の捕獲試薬を用いてピコグラム量のB型肝炎ウイルスDNAをひと血清から単離し、ハイブリダイゼーションにより定量した。

以上、この発明の総括的記載を行ったが、さらに具体的な実施例によりこの発明について説明を行う。ただし、特記しない限り限定を意図するものではない。

【実施例】

A. 水溶液からの核酸の単離。

基本的プロトコル(下記実施例における記載に従い変更)。核酸溶液(通常30-100μlの容量)をプラスチック製微量遠心分離管中に等分する。捕獲試薬の懸濁液を個別の管において調製する。(まず捕獲試薬を臨床用遠心分離器中3分間の遠心分離で沈殿させることによりこの懸濁液を調製する。3倍容量の脱イオン水を沈殿物に加える。試薬が均一に懸濁するまで、水および捕獲試薬を数秒間激しい渦巻状にして混合する)。懸濁した捕獲試薬(通常50-100μlの容量)をDNA試料に加え、管を渦巻状にし、直ちに室温で30分間回転器上に置く。管を回転器から除き、室温で30分間微量遠心分離器または臨床遠心分離器中最高速度で遠心分離する。この遠心分離か

ら得られた沈殿物は、捕獲試薬およびそれに結合した核酸、すなわち捕獲試薬-核酸複合体を含有する。沈殿物を300μlのTE緩衝液で洗浄し、前と同様に遠心分離する。0.5モルのNaOH(通常500μlの容量)を捕獲試薬沈殿物に加える。管を激しい渦巻状にして捕獲試薬およびNaOHを混合し、直ちに管を室温で10分間回転器上に置く。管を前と同様に遠心分離する。液体シンチレーション計数法(核酸が放射性である場合)または核酸と固体支持体の結合、次いで適当な検出用プローブによるハイブリダイゼーションを行うプロッティング・プロトコルにより、上清(試薬から放出された核酸を含有)の特性を証明する。

実施例1

核酸試料は、30μlのTE緩衝液(T E 緩衝液は10ミリモルのトリス-HCl、pH 7.5、1ミリモルのEDTA)中11ngの放射性DNAを含有していた。放射性DNAは、ベゼスダ・リサーチ・ラボラトリーズにより販売されている「1Kbランダ」であり、³²Pで標識された、1キロペ

- 23 -

- 24 -

ースの増加重で大きさの変わる酵母DNA配列のフラグメントを成分とする。様々な実験において、標識DNAの77-95%が試薬により結合した。これらの同じ高水準の捕獲率は、3モル、0.1モルのNaClを含有または追加のNaClを含まないTE緩衝液、および500ミリモルのEDTAを含むTE緩衝液中において達成された。これらの実験において、前記と同様0.5モルのNaOHで処理することにより、77-100%の結合DNAが放出された。これらの実験は、DNAが核酸の研究で常用の緩衝液から捕獲され得ること、および捕獲は塩の濃度とは無関係であることを示す。

実施例2

ニクトランスレーションにより³²Pでラベルされたファージ・ラムダDNAを用いて実施例1の場合と同様の実験を行った。同様の結果が得られた。すなわち、捕獲は実験で使用されたDNA配列とは無関係である。(肝炎および乳頭腫ウイルス配列の捕獲は後記実施例9-12に記載され

ている)。

実施例3

DNA溶液の量および体積を変えて実施例1の場合と同様の実験を行った。これらの実験は、比較的小量のDNAが比較的多量の溶液から捕獲され得ること(例、TE緩衝液0.5mlから10ngのDNAの95%捕獲)、および比較的大量のDNAが比較的小量の溶液から捕獲され得ること(例、30μlのTE緩衝液から1μgのDNAの95%捕獲)を示した。全ての場合において、0.5モルのNaOHで処理することにより、捕獲されたDNAが80%を越える割合で放出された。pg量のウイルス性DNAの捕獲、放出および検出を後記実施例9-12に示す。

実施例4

DNAが蛋白質変性原を含む水溶液中に存在する場合において、実施例1と同様の実験を行った。全ての場合において、捕獲されたDNAが80%を越える割合で捕獲され、80%より大きい割合で放出された。試験溶液は、8モルの尿素、5%

のドデシル硫酸ナトリウムまたは6モルのグアニン塩酸塩を含有した。

実施例5

放射性RNAを用いて実施例1の場合と同様の実験を行った。90%を越えるRNAが捕獲され、NaOH処理により90%より多い放射能が放出された。RNAは、ファージT7 RNAポリメラーゼを用いてクローニング頭腫ウイルスDNA配列をコピーすることにより製造された乳頭腫ウイルス18ゲノムのコピーであった。この実験は、捕獲試薬がRNAと結合することを示す。

実施例6

実験(実施例1)の場合と同様のプロトコルを用いて、³²Pで末端標識した、ファージ・ラムダDNAのHind IIIフラグメントを捕獲し、NaOHにより放出させた。DNAをアルカリ性アガロース・ゲル上で電気泳動させ、ゲルをオートラジオグラフィーに掛けた。正確な予想通りの大きさの非減成DNA分子が、TE緩衝液から捕獲されたDNA試料およびひと血清から捕獲されたDNA

試料中に存在した。また、「IKBラダー」(酵母DNAフラグメントを成分とし、ベゼスダ・リサーチ・ラボラトリーズにより販売)を実験で使用すると、非減成DNA分子が得られた。すなわち、僅か約300bpないし1000bpを越える範囲の大きさのDNA分子は、捕獲試薬を用いてインタクト(intact)形態で単離され得る。

B. ひと血清からのDNAの単離。

実施例7

健康な男性から採取した50μlの血清(シグマ・ケミカル・カンパニーから購入)を処理してウイルス粒子を崩壊し、ウイルスDNAを遊離させ、1μlの³²P標識ファージ・ラムダDNA(10ng)を加えた。この試料を1時間65°Cでインキュベーションした。(この処理はウイルス粒子の崩壊および蛋白質除去に常用される)。50μlの懸濁捕獲試薬を血清試料に加え、室温で30分間回転器上に置いた。捕獲試薬(および結合DNA)を実施例1と同様遠心分離により単離し、0.5-NaOHで処理することにより結合DNAを放出させ、

- 27 -

- 28 -

液体シンチレーション計数管で計数した。代表的実験では、標識DNAの80%が捕獲試薬により結合し、結合DNAの95%が放出された。この実験は、DNAが血清から単離され得ることを示している。前記実施例6に記載された実験は、血清から単離されたDNAが捕獲後に非減成状態であることを示している。

実施例8

2mlの血清を使用して(これは通常、捕獲試薬を用いたこの明細書記載の方法と同程度に単純な方法によっては分析され得ない血清量である)、実施例7の場合と同様の実験を行った。500μlの捕獲試薬と室温で15時間インキュベーションを行った。140ngまたは100pgの標識ファージ・ラムダDNAを使用する代表的実験の場合、90%を越えるDNAが試薬により結合し、95%の結合DNAがNaOH処理により放出された。この実験は、DNAが比較的大量(ml)の血清から有効に捕獲され得ること、すなわちこの試薬の診断用途の可能性が、血清中のウイルスまたはDN

A濃度が非常に低い状況にまで広がり得ることを示している。

実施例9

非放射性DNAが血清から単離され、プロッティング・プロトコルにより定量され得るか否かを決定するために、次の実験を実施した。健康な男性から得られた血清50μlのアリコートを0~100pgの範囲の量の非標識DNAにより「スパイク」して実施例7の場合と同様の実験を行った。DNAは、B型肝炎ウイルス・ゲノムのコピーを含むクローニングされたプラスミドDNAであった。実施例7と同様にDNAを捕獲および放出させた。真空ポンプに取り付けた「ドット・プロット」装置(ベゼスダ・リサーチ・ラボラトリーズ)を用いて試料をナイロン膜(バイオダイル、ポール・コーポレイテッド)に適用した。また、陽性対照および濃度標準として0.5N-NaOH中500μlアリコートのプラスミドDNAも同様に適用した。また、0.5N-NaOHのみを成分とする陰性対照も適用した。ナイロン・フィルター

をB型肝炎ウイルスDNAと相同性の放射性RNAとハイブリダイゼーションし、洗浄し、標準プロトコルによりオートラジオグラフィーに掛けた。オートラジオグラフィー検査は、血清中にスパイクされた0.5 pgのDNAが検出され得ることを示した。スパイクされたDNAを含まない血清試料から得られた試料は、オートラジオグラフにおいてシグナルを与えたなかった。捕獲されたDNA試料から得られたオートラジオグラフィー・シグナルおよび非捕獲の陽性対照試料から得られたシグナルの比較結果は、検出有効性が約50%であることを示している。この実験は、捕獲試薬を用いて非常に低レベルの非特異的基底値シグナルを伴う血清中に存在するウイルスDNA配列を単離および検出し得ることを示した。

実施例10

以下の実験を行うことにより、ウイルス粒子中に存在するDNAが血清から単離され、定量され得るか否かを決定した。肝炎の臨床徴候があり、血液検査の結果、B型肝炎ウイルス、HBcおよび

HBs抗原に関して陽性であり、以前に血清が50 μl当たり500 pgを越えるB型肝炎ウイルスDNAを含むものと測定された患者から血清試料を得た。この血清の一連の系列希釈を正常(非感染)血清中へ行い、50 μlのアリコートを実施例7と同様捕獲試薬により処理した。実施例9と同様、捕獲試薬により放出されたDNAをナイロン・フィルターに結合させ、ハイブリダイゼーションにより定量した。この実験結果は、患者の血清が50 μl当たり約600 pgのB型肝炎ウイルスDNAを含むこと、および1/1200の希釈率のDNA(約0.5 pgのウイルスDNAを含有)が基底値を越えて明白に検出され得ることを示していた。

実施例11

肝炎(ただし、必ずしもB型肝炎ではない)の臨床徴候を呈する患者から得られた17の血清試料のパネルを実施例10と同様に試験した。B型肝炎ウイルスHBcおよびHBs抗原を共に含む全試料においてB型肝炎ウイルスDNAが検出された。

-31-

捕獲試薬を用いる検定は、個々の試料が血清50 μl当たり5~500 pgのウイルスDNAを含むことを示した。B型肝炎ウイルスHBcおよびHBs抗原を含まない血清試料ではB型肝炎ウイルスDNAは検出されなかった。この実験(実施例10の場合と共に)は、この捕獲試薬を診断試験で用いることにより、高感度でひと血清におけるウイルスDNAの存在を検出し得ることを示している。

C. ひと頸管試料からのDNAの単離。

実施例12

乳頭腫ウイルスの存在に関して陰性の試験結果であった女性から得られた頸管上皮細胞を含むスワップを試薬溶液中でインキュベーションすることにより、頸管試料中のウイルス粒子を全て崩壊した。スワップを溶液から除去後、約200 μlの溶液を得た。この溶液を2つの100 μlアリコートに分けた。第1のアリコートには、クローン乳頭腫ウイルス18配列を含む所定量のプラスミドを加えた。第2のアリコートには追加のDNAを

加えなかった。頸管試料の第1アリコートに加えられたDNAの量は、それぞれ100、10または1 pgのプラスミドDNAであった。各DNA濃度を有する3つの同じ試料を調製した。すなわち、全部で18試料(9スワップ、各々2種のアリコートに分割、一方のアリコートは追加のDNAを含有させない)を調製した。18試料の各々に30 μlの懸濁捕獲試薬を加え、本質的に実施例1の記載と同様、核酸を捕獲させ、0.5 NのNaOHにより放出させた。実施例9と同様ドット・ブロッティングにより、放出されたDNA試料をナイロン膜に固定化した。また同様の方法で、陽性対照および検出濃度標準として0.5モルのNaOH中乳頭腫ウイルスDNA含有プラスミドDNAの500 μlアリコートおよびDNAを含まない0.5モルNaOHのアリコート(陰性対照として)もフィルターに適用した。

フィルターを放射性乳頭腫ウイルスRNA(T7ファージRNAポリメラーゼを用いて乳頭腫ウイルス・ゲノムのコピーを含むクローン・プラス

-32-

ミドDNAをコピーすることにより製造)とハイブリダイゼーションした。ナイロン・フィルター上における乳頭腫ウイルスDNA検出の標準方法を用いて、フィルターのハイブリダイゼーションおよびポスト・ハイブリダイゼーション洗浄を行った。フィルターをオートラジオグラフィーに掛けた。オートラジオグラフは、42時間のオートラジオグラフ曝露後に頸管試料中に「スパイクされた」乳頭腫DNAのアリコートが検出され得ることを示した。さらに、乳頭腫DNAを加えなかつた各頸管試料のアリコートは、オートラジオグラフにおいてシグナルを発さず、捕獲試薬により処理された試料中で非特異的シグナルが得られなかつたことを示している。レーザー・デンシトメーター(エルケービー・インスツルメンツ、インコボレイティッド)を用いて頸管試料から得られたオートラジオグラフィーのシグナルおよび陽性対照標準から得られたシグナルをスキャンし、これらを比較することにより、捕獲されたDNAの検出効率を測定した。10pgスポットの場合、この値

は25-31%であった。この実験は、捕獲試薬を用いることにより、非常に低い非特異的基底値を有するひと頸管試料に存在する乳頭腫ウイルス配列の単離および定量が可能であることを示している。すなわち、捕獲試薬を臨床試験で用いて頸管試料に存在するウイルス性核酸を検出することができる。

D. ひとの尿からのDNAの単離。

実施例13

健康な男性から尿を採取した。100ピコグラムの放射性ファージ・ラムダDNAを50μlまたは500μlアリコートの尿に加えた。尿を実施例7と同様1時間65℃でインキュベーションした。100μlの懸濁捕獲試薬を各アリコートに加え、DNAを15時間捕獲させ、実施例1と同様に放出させた。尿中に最初から「スパイクされた」DNAに対する放出DNAの全体的収率は、各々50μlアリコートの尿の場合54%および500μlの尿の場合55%であった。すなわち、捕獲試薬を用いて尿からDNAを単離することができる。

-35-

できる。

E. 本発明のメチジウムースペルミン捕獲試薬およびアクリルアミドーエチジウム試薬の比較。

バチェック等、「アナリティカル・バイオケミストリー」(Analytical Biochemistry)、124巻、414-420頁(1982年)に記載されたアクリルアミドーエチジウム試薬の2種の製剤を合成了。それらのDNA捕獲能をこの発明によるチジウムースペルミンセファロース捕獲試薬の2製剤の場合と比較した。

-36-

アクリルアミドーエチジウム試薬の場合、ひと血清、蛋白質変性原で処理されたひと血清およびひと尿に各々存在するDNAに対するアフィニティーが非常に低かった。逆に、メチジウムースペルミン試薬はこれらの溶液中に存在するDNAの90%を捕獲した。すなわち、この発明の試薬は、アクリルアミドーエチジウム試薬の使用を排除する臨床適用例において使用され得る。

また、イオン強度の異なる緩衝液における2つのタイプの試薬の相対的なDNA結合能力を検査した。この発明のメチジウムースペルミン試薬は、3モルNaClと同じ高さの塩濃度で80%を越えるDNAと結合した。対照的に、アクリルアミドーエチジウム試薬は、1モルまたはそれを越えるNaCl濃度で著しく低いDNA結合能力を呈した。この特徴によりアクリルアミドーエチジウム試薬は、イオン強度において変化の可能性があり得るか、または1モルを越える塩を含む試料の分析において、この発明による試薬よりも有用性の面でかなり劣ることになる。

A. 実験の詳細

1. 試験製剤。

「好ましい具体例の記載 - A. 捕獲試薬の合成」の項に従い、メチジウムースペルミン-セファロース試薬の2種の製剤(製剤#4および#5)を合成した。

アクリルアミド-エチジウム試薬の2種の製剤をバチェック等の記載に従い正確に調製した(製剤#1および#2)。

所定量の懸濁試薬が各製剤において等重量の試薬を含有するように、4種の試薬製剤全部を蒸留水に懸濁した。

2. 試薬反応。

反応を次の要領で行った。試料を100μlの容量にした。試料は、(a)蛋白質変性原で処理したひと血清(肝炎ウイルスDNA検出の標準プロトコル)、(b)未処理ひと血清、50μlのひと血清に50μlのTE緩衝液(10ミリモルのトリスHCl、1ミリモルのEDTA、pH 7.5)を加えたもの、および(c)ひと尿(健康な男性から採取したもの)、および(c)ひと尿(健康な男性から採取し

た100μlの尿を使用)であった。

これらの溶液(全容量100μl)の各々に、5μlのTE緩衝液中8ngの³²P-標識DNA(ビーアールエル、1KBラダー)を加えた。50μlの懸濁捕獲試薬を加え、管を室温で30分間回転器上に置いた。管を3分間微量遠心分離器中で回転させ、上清をマイクロビペットで除去し、5%トリクロロ酢酸(TCA)の溶液中に放出させた(未捕獲放射性DNAがあれば全て沈殿させるため)。捕獲試薬沈殿物を300μlのTE緩衝液で洗浄し、前と同様に回転させ、上清を5%TCA溶液に加えた。TCA溶液をグラスファイバー・ディスクでろ過し、液体シンチレーション計数管で計数した。捕獲されなかったDNAの量を測定し、差により捕獲されたDNAの量を計算した。全試料を3回ずつ試験した。

捕獲に対する塩濃度の影響を検査する実験のために、8ngの³²P標識DNAおよび所定モル量のNaClを含むTE緩衝液の100μl試料を50μlの懸濁捕獲試薬とインキュベーションし、さ

-39-

らに前述の血清試料の場合と同様に分析した。

B. 結果。

血清および尿捕獲実験の結果を下記第1表、A部に示す。この発明のメチジウムースペルミン試薬の両製剤は処理された血清、未処理血清または尿に存在するDNAの>90%を捕獲した。対照的に、アクリルアミド-エチジウム試薬の製剤はいずれも血清から検出可能量のDNAを一切捕獲せず、少額のDNAしか尿から捕獲されなかった。すなわち、これらの試料には捕獲を抑制する成分が存在することになる。この抑制の化学作用についてはそれ以上分析しなかった。さらに、血清はアクリルアミド-エチジウム試薬から結合エチジウムの大部分を放出させるとと思われ、エチジウムはこれらの溶液中のアクリルアミド・マトリックスと安定した結合状態にはないことを示している。反対に、この発明のメチジウムースペルミン試薬におけるメチジウムは、これらの実験においてセファロース・マトリックスと安定した結合状態にあった。

-40-

異なる濃度のNaClで実施された捕獲実験の結果を第1表、B部に要約する。この発明の試薬によるDNAの結合は、0ないし3モルのNaCl塩濃度に対して比較的影響を受けにくい。反対に、アクリルアミド-エチジウム試薬によるDNAの結合は1モルのNaClで低下し、3モルのNaClにおける結合能は、試薬製剤の1つにおけるNaClの非存在下での値の12%程度の低さである。

第1表

メチジウムースペルミンおよびアクリルアミード-エチジウム核酸捕獲試薬の非核

A. DNA捕獲に対する血清の影響

	処理血清	未処理血清	尿	(捕獲DNAの%)*
メチジウムースペル ミン製剤#4	9.6	9.5	ND	
メチジウムースペル ミン製剤#5	9.6	9.3	9.2	

アクリルアミドーエ				
チジウム製剤#1	0	0	8	
アクリルアミドーエ				
チジウム製剤#2	0	0	8	

* 3回の試料の平均。

N.D.=測定せず。

この発明は、前述の適用方法および具体例に限定される訳ではない。挿入手段によりこの発明の捕獲試薬と核酸を結合させ得る修正も全て含まれる。これらの均等な内容事項も特許請求の範囲内に含まれるものとする。

特許出願人 ライフ・テクノロジーズ・

インコーポレイテッド

代理人 弁理士 青山 葵 ほか1名

B. DNAの捕獲に対するNaCl濃度の影響

<u>NaClのモル数</u>	0	0.5	1.0	2.0	3.0
	<u>(捕獲DNA%)*</u>				

メチジウムースペル

ミン製剤#4	95	88	93	82	93
--------	----	----	----	----	----

メチジウムースペル

ミン製剤#5	97	97	99	99	99
--------	----	----	----	----	----

アクリルアミドーエ

チジウム製剤#1	98	93	59	49	39
----------	----	----	----	----	----

アクリルアミドーエ

チジウム製剤#2	98	90	36	20	12
----------	----	----	----	----	----

* 3回の試料の平均。

-44-

-43-